

· 论 著 ·

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.18.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200814.1717.010.html\(2020-08-17\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20200814.1717.010.html(2020-08-17))

胃癌 NOTCH3 的表达及其对细胞凋亡的影响研究*

黄婷婷^{1,2}, 黄汉莲¹, 肖利佳¹, 余蕙君¹, 袁新华¹, 周义文^{1△}
(1. 南方医科大学深圳医院临床检验医学中心, 广东深圳 518020; 2. 香港中文大学
威尔斯亲王医院解剖细胞病理科, 香港 999077)

[摘要] **目的** 探讨 NOTCH3 在胃癌细胞中的表达水平及其对胃癌细胞凋亡的影响。**方法** Western blot 检测 NOTCH3 蛋白在正常胃组织及胃癌细胞的相对表达水平。siScramble 或 si-NOTCH3-1、si-NOTCH3-2 转染 AGS 和 MKN28 细胞,通过实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)及 Western blot 判断 siRNA 的转染效率;采用膜联蛋白 V(Annexin V)/碘化丙啶(PI)双染,流式细胞仪检测转染后 AGS 和 MKN28 的细胞凋亡率;Western blot 检测转染后 AGS 和 MKN28 的 cleaved-DNA 修复酶(PARP)和 cleaved-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3 的相对表达水平。**结果** 胃癌细胞中 NOTCH3 蛋白相对表达水平高于正常胃组织。si-NOTCH3-1、si-NOTCH3-2 转染后 AGS 和 MKN28 的细胞凋亡率明显升高。随着 si-NOTCH3-2 转染浓度的逐渐升高,NOTCH3 蛋白的相对表达水平逐渐降低,而 cleaved-PARP 和 cleaved-Caspase-3 水平逐渐升高,且呈现明显的剂量依赖。**结论** NOTCH3 在胃癌中表达增多,其可抑制胃癌细胞凋亡,促进胃癌进展。

[关键词] 受体,Notch3;胃肿瘤;细胞凋亡;聚 ADP 核糖聚合酶类;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

[中图法分类号] R73-35 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2020)18-2979-05

Study on the expression of NOTCH3 in gastric cancer and its effect on apoptosis*
HUANG Tingting^{1,2}, HUANG Hanlian¹, XIAO Lijia¹, YU Huijun¹, YUAN Xinhua¹, ZHOU Yiwen^{1△}
(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518020, China; 2. Department of Anatomical and Cellular Pathology, Prince of Wales Hospital, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression level of NOTCH3 in gastric cancer cells and its effect on apoptosis of gastric cancer cells. **Methods** Western blot was used to detect the expression level of NOTCH3 protein in normal gastric tissues and gastric cancer cells. SiScramble or si-NOTCH3-1, si-NOTCH3-2 were transfected into AGS and MKN28 cells, and real-time fluorescent quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) and Western blot was used to judge the transfection efficiency of siRNA. Annexin V/propidium iodide (PI) double staining was used, and the apoptotic rate of AGS and MKN28 after transfection was detected by flow cytometry; Western blot was used to detect the relative expression levels of cleaved-DNA repair enzyme (PARP) and cleaved-cysteine-containing aspartate proteolytic enzyme (Caspase)-3 of AGS and MKN28 after transfection. **Results** The expression level of NOTCH3 protein in gastric cancer cells was much higher than that in normal gastric tissues. After si-NOTCH3-1 and si-NOTCH3-2 transfection, the apoptotic rate of AGS and MKN28 significantly increased. With the increase of the transfection concentration of si-NOTCH3-2, the expression level of NOTCH3 protein decreased, while the levels of cleaved-PARP and cleaved-Caspase-3 increased, which showed an obvious dose-dependence. **Conclusion** NOTCH3 expresses more in gastric cancer, which could inhibit apoptosis of gastric cancer cells and promote the progress of gastric cancer.

[Key words] receptor, Notch3; stomach neoplasms; apoptosis; poly (ADP-ribose) polymerases; Caspase-3

胃癌是全球发病率排名第 5、病死率排名第 3 的恶性肿瘤,我国乃至整个东亚都是胃癌的高发地

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81974457);广东省区域联合基金项目(2019A1515110120);广东省深圳市宝安区 2019 年基础健康研究项目(2019JD433);广东省深圳市三名工程医学项目(SZSM201612023);南方医科大学深圳医院苗苗计划(2018MM01)。 作者简介:黄婷婷(1985—),主管技师,博士,主要从事消化系统肿瘤及临床微生物感染的基础与临床研究。 △ 通信作者, E-mail: yiwenzhou21@yeah.net。

区^[1]。明确胃癌发生、发展的分子机制,对其诊疗有十分重要的作用。NOTCH 信号通路是一种保守且作用明显的细胞内通路,其可以调节细胞增殖、凋亡和分化,在癌症中亦有重要作用^[2]。哺乳动物有 4 个 NOTCH 受体和 5 个 NOTCH 配体^[3]。目前,有关 NOTCH 信号通路在胃癌的功能研究中,大多数研究集中在 NOTCH1。NOTCH1 激活是胃癌患者预后不良的因素,高表达的 NOTCH1 与肿瘤分化、肿瘤侵袭深度、淋巴结转移等有关^[4]。此外,NOTCH3 也是 NOTCH 受体家族的一员。有报道指出,NOTCH3 过表达与肠型胃癌和更好的组织学分化相关,提示其可能是 1 个良好的预后指标^[5]。但 NOTCH3 在胃癌发生、发展中的表达及具体分子机制仍未明确且有争议。肿瘤细胞生长失调,是其无限增殖和凋亡失衡的共同结果。本研究检测胃癌细胞与正常胃组织中 NOTCH3 的相对表达水平,通过 siRNA 沉默的方法,分析 NOTCH3 对胃癌细胞增殖及凋亡的影响和机制,从而明确 NOTCH3 在胃癌中的表达、功能及分子机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

AGS、MKN28 细胞购自中国科学院上海生科院细胞资源中心;胎牛血清、RPMI1640 培养基、胰酶、磷酸盐缓冲液(PBS)等购自美国 Gibco 公司;脂质体 2000 购自美国 Thermo Fisher 公司;siScramble(SI03650318)、siNOTCH3-1(SI00009499)、siNOTCH3-2(SI00009513)购自德国 Qiagen 公司;总 RNA 提取试剂盒和实时荧光定量逆转录 PCR(RT-qPCR)试剂盒购自大连宝生物工程有限公司;cleaved-DNA 修复酶(PARP, Asp214, 1:1 000, #9541)、cleaved-含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3(Asp175, 1:1 000, #9661)、NOTCH3(D11B8, 1:1 000, #5276)、GAPDH(1:2 000, #2118)抗体均购自美国 CST 公司;二抗兔抗 IgG-(辣根过氧化物酶)HRP(1:10 000, 00028856)购自丹麦 Dako 公司;ECL plus 显影试剂盒购自美国 Merk Millipore 公司。二氧化碳培养箱(Thermo HERA cell 150)购自美国 Thermo 公司;流式细胞仪(BD FACS Calibur)购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及转染

由于 NOTCH3 在 AGS 及 MKN28 细胞系中呈现高表达,且转染效率高,故选用这两株细胞系进行 siRNA 转染实验。AGS、MKN28 细胞采用含 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液培养,细胞置于 37℃、5% CO₂ 条件下恒温培养。取对数生长期的胃癌细胞,制备单细胞悬液,计数后 1×10⁶ 个接种于 6 孔板,根据说明书,先将 5 μL 脂质体 2000 与 siScramble 或 si-NOTCH3-1、si-NOTCH3-2(10、20、50 nmol/L)轻轻混匀后于室温静置 15 min,然后用无血清培养基

洗涤细胞后将脂质体 2000 与 siScramble 或 si-NOTCH3-1、si-NOTCH3-2 的混合物加入无血清培养基后,置于 37℃、5% CO₂ 孵育 4 h 换为完全培养基继续培养。再用 si-NOTCH3-1 及 si-NOTCH3-2 转染 AGS 和 MKN28 细胞系 48 h 后,采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测各细胞中 NOTCH3 mRNA 和蛋白表达水平,并采用流式细胞仪检测 AGS 及 MKN28 的细胞凋亡率。

1.2.2 RT-qPCR

按照参考说明书,用 TRIzol 总 RNA 提取试剂盒提取 AGS、MKN28 及转染 24 h 的上述 siRNA 的总 RNA,并逆转录成 cDNA。采用逆转录产物 cDNA 作为 PCR 检测模板,反应体系为 20.0 μL,包括 2×SYBR MasterMix 10.0 μL,正向引物 0.4 μL,反向引物 0.4 μL,模板 2.0 μL,无酶水 7.2 μL。PCR 扩增条件:95℃ 5 min;95℃ 30 s,60℃ 30 s,40 个循环;PCR 扩增从 60℃ 开始检测溶解曲线,以 GAPDH 为内参,计算不同检测管中的 PCR 扩增循环数(Ct)值,用相对定量 2^{-ΔΔCt} 计算细胞中 NOTCH3 mRNA 相对表达水平。NOTCH3 引物序列:正向 5'-GTC GTG GCT ACA CTG GAC CT-3',反向 5'-AAT GTC CAC CTC GCA ATA GG-3'。B2M 引物序列:正向 5'-ACT CTC TCT TTC TGG CCT GG-3',反向 5'-ATG TCG GAT GGA TGA AAC CC-3'。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

选择对数生长期不同的胃癌细胞,2×10⁵ 个接种于 6 孔板,做不同处理后,放置孵箱继续生长 48 h,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)胰酶消化细胞,并收集至离心管内,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液用冰冷 PBS 洗涤 1 次,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入稀释好的 1×binding buffer 混匀转移至流式管,加入 5 μL 膜联蛋白 V(Annexin V),再加入 5 μL 碘化丙啶(PI),轻轻混匀,4℃ 避光,静置染色 20 min,然后加入 0.5 mL 1×binding buffer,上流式细胞仪检测分析每管细胞的凋亡比例。

1.2.4 Western blot 检测细胞增殖及凋亡相关蛋白的相对表达情况

收集对数生长期细胞,RIPA 裂解液冰上提取细胞总蛋白,充分裂解后,4℃ 10 000 r/min 离心 10 min,取上清液,按照 BCA 试剂盒说明测定蛋白相对表达水平,取 30 μg 总蛋白经 10% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,转膜至硝酸纤维素膜上。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h 后,分别与抗体 NOTCH3(1:1 000)、cleaved-PARP(1:1 000)和 cleaved-Caspase-3(1:1 000),及 GAPDH(1:1 000)4℃ 过夜孵育,第 2 天加入 HRP 标记的二抗,室温孵育 1 h,增强化学发光显色。

1.3 统计学处理

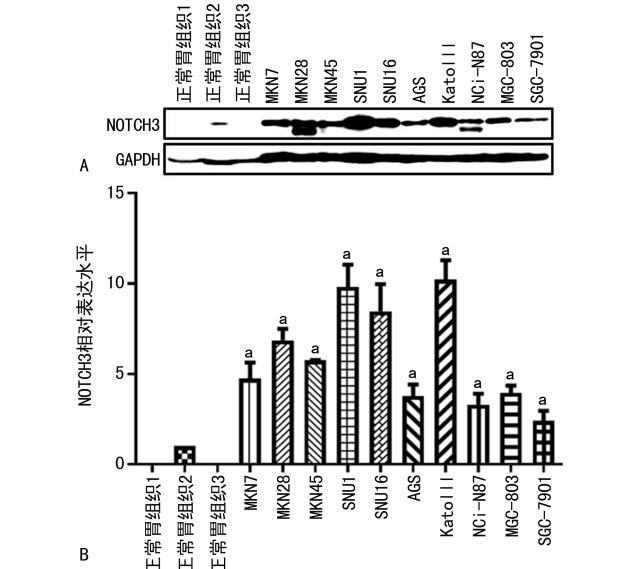
采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,采用 Graph-

Pad Prism6 软件进行统计图绘制,计量资料以频数或百分率表示,组间比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 NOTCH3 蛋白在胃癌细胞及正常胃组织中的相对表达情况

NOTCH3 受体在胃癌细胞中呈高表达,而正常胃组织的 NOTCH3 蛋白表达水平低于胃癌细胞。其中,在 MKN28 和 NCI-N87 细胞系中出现了非特异性条带。10 种胃癌细胞中,NOTCH3 蛋白的相对表达水平高于正常胃组织的表达水平,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 1。

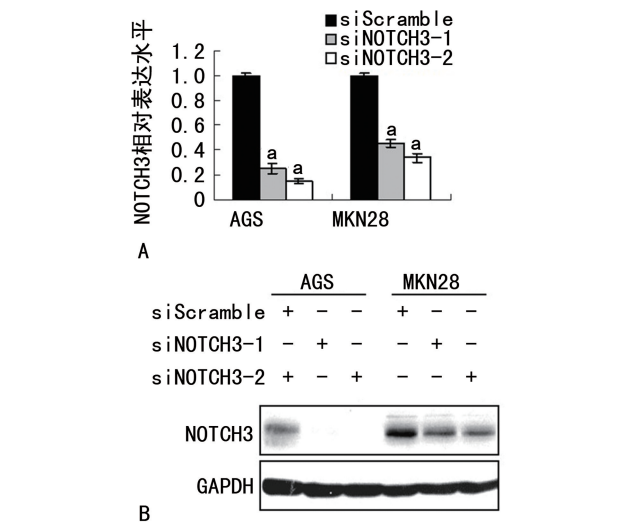


A:Western blot 检测正常胃组织及胃癌细胞中 NOTCH3 蛋白的相对表达情况;B:Western blot 灰度图;^a: $P<0.05$,与正常胃组织比较。

图 1 NOTCH3 mRNA 及蛋白在正常胃组织和胃癌细胞中的相对表达情况

2.2 NOTCH3 蛋白在转染后 AGS 及 MKN28 细胞中的相对表达情况

与 siScramble 转染的细胞比较,si-NOTCH3-1 及 si-NOTCH3-2 转染后 AGS 及 MKN28 细胞 NOTCH3 mRNA 及蛋白表达水平明显减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 2。

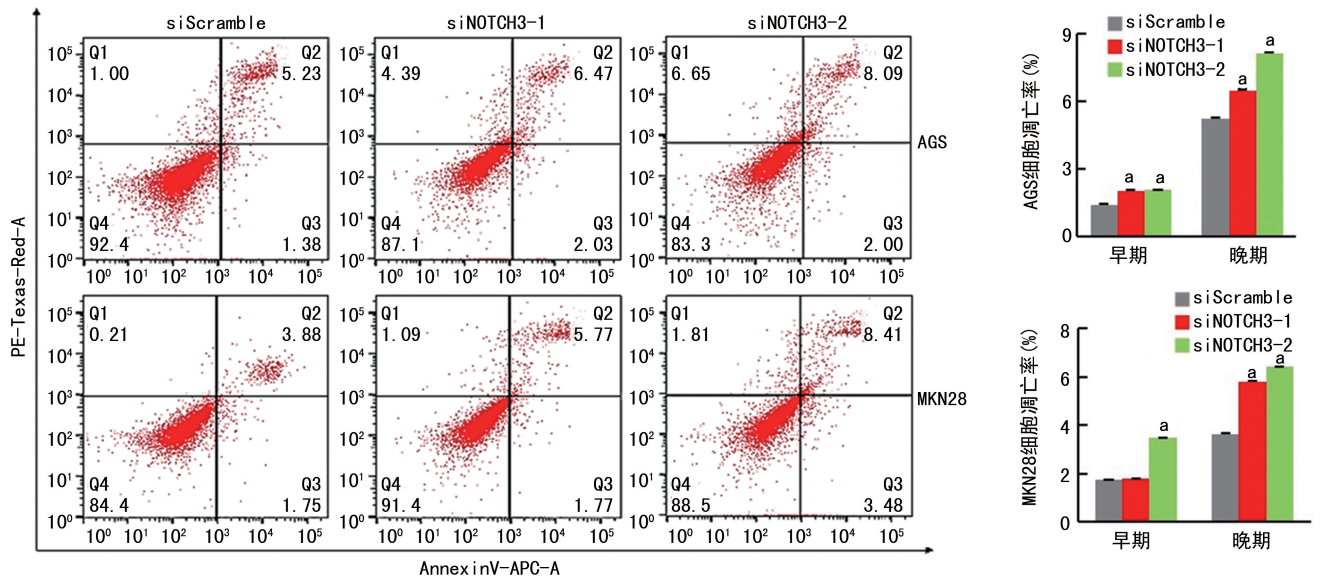


A:NOTCH3 mRNA 的相对表达水平柱状图;B:NOTCH3 蛋白的 Western blot;^a: $P<0.05$,与 siScramble 比较。

图 2 NOTCH3 mRNA 及蛋白在转染后 AGS 及 MKN28 细胞中的相对表达情况

2.3 si-NOTCH3-1 及 si-NOTCH3-2 对 AGS 及 MKN28 细胞凋亡的影响

与 siScramble 转染的细胞比较,si-NOTCH3-1 及 si-NOTCH3-2 转染后 AGS 及 MKN28 细胞的细胞凋亡率明显升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见图 3。



^a: $P<0.05$,与 siScramble 比较。

图 3 流式细胞仪检测细胞凋亡率

2.4 抑制 NOTCH3 的表达在 AGS 及 MKN28 细胞中对凋亡相关蛋白表达的影响

与 siScramble 转染的细胞比较, si-NOTCH3-2 转染后 AGS 及 MKN28 细胞的 NOTCH3 蛋白相对表达水平降低, 而 cleaved-PARP 和 cleaved-Caspase-3 水平升高。随着 si-NOTCH3-2 转染浓度的逐渐升高, NOTCH3 蛋白的相对表达水平逐渐降低, 而 cleaved-PARP 和 cleaved-Caspase-3 水平逐渐升高, 且呈现明显的剂量依赖, 见图 4。

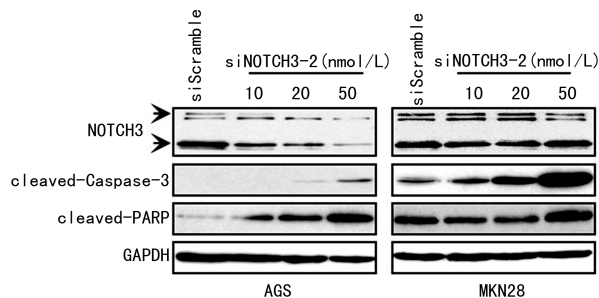


图 4 Western blot 检测 cleaved-Caspase-3 和 cleaved-PARP 蛋白表达水平

3 讨论

胃癌具有发病率高、病死率高的特点, 发病机制十分复杂, 涉及基因的异常表达等, 多种遗传和表现遗传改变参与其发生、发展, 如癌基因激活、抑癌基因失活、DNA 错配修复的基因突变等^[6]。多种信号通路, 如 Wnt/ β -catenin、NOTCH、Hippo, 以及 NF- κ B 和表皮生长因子受体都参与了胃癌的发生发展^[7]。NOTCH 信号通路是一种进化上保守的途径, 对发育中的胚胎和成熟组织中细胞生长的确定具有重要意义。干细胞维持、细胞生长决定和诱导分化是 NOTCH 信号通路在自我更新组织中的 3 大功能^[8]。NOTCH 受体属于跨膜蛋白, 有跨膜区、细胞内和细胞外区 3 个部分组成, NOTCH 信号通路的激活取决于配体诱导的 NOTCH 受体蛋白水解裂解, 随后 NOTCH 受体可释放 NOTCH 的细胞内结构域 (NICD), NICD 转移到细胞核, 激活多个转录程序, 控制不同的细胞功能, 如细胞的增殖与凋亡等^[9]。在结直肠癌、乳腺癌和胰腺癌中, NOTCH 是 1 种重要的致癌因子^[10-11]。在结直肠肿瘤中, NOTCH3 在原发和转移标本中明显上调, 明显促进肿瘤细胞的增殖^[12]。NOTCH3 积累与 II、III 期结直肠癌患者肿瘤复发有关^[13]。但在胃癌中, NOTCH3 的发病机制还未具体阐明。在这里, 本课题组发现 NOTCH3 在胃癌细胞中上调, 且能抑制胃癌细胞的凋亡从而促进胃癌的进展。本实验也通过流式细胞仪检测了 NOTCH3 低表达的胃癌细胞的细胞周期分布情况, 发现了 NOTCH3 的低表达促进了胃癌细胞的凋亡。

这提示在胃癌的诊断及治疗中, NOTCH3 有可能是一个有效的诊疗靶点。

正常情况下, 细胞凋亡和细胞增殖存在一个动态平衡, 当细胞凋亡受到抑制, 这种平衡就会打破, 导致细胞异常增殖^[14]。目前已发现的凋亡途径主要有外源性的死亡受体途径、内源性的线粒体途径及近年来发现的内质网途径。细胞增殖与凋亡受 PARP、Caspase-3 等多种增殖和凋亡相关基因调控。PARP 是细胞凋亡核心成员 Caspase 的切割底物, 也是细胞凋亡发生的促进因子, PARP 剪切促进细胞崩解并可以作为细胞凋亡发生的标志之一, 也通常被认为是 Caspase-3 激活的指标^[15]。Caspase-3 是天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶家族的核心成员, 是细胞凋亡过程中的效应蛋白, 处在 Caspase 级联反应的下游, 受到凋亡信号刺激后被激活, 其活化是细胞进入不可逆凋亡的标志^[16]。本研究检测结果显示, 抑制胃癌细胞 NOTCH3 的表达可明显上调 cleaved-PARP、cleaved-Caspase-3 蛋白表达, 且呈现剂量依赖性, 实现对胃癌细胞凋亡的调控。

综上所述, NOTCH3 能够抑制胃癌细胞的凋亡, 从而促进了胃癌的进展。本研究发现了 NOTCH3 受体在胃癌进展中的功能和分子机制, 为胃癌的发病机制的阐明提供一定的理论基础和新的思路。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6):394-424.
- [2] RANGANATHAN P, WEAVER K L, CAPOBIANCO A J. NOTCH signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(5):338-351.
- [3] ANDERSSON E R, LENDAHL U. Therapeutic modulation of NOTCH signalling—are we there yet? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(5):357-378.
- [4] ZHANG H, WANG X, XU J, et al. NOTCH1 activation is a poor prognostic factor in patients with gastric cancer[J]. Br J Cancer, 2014, 110(9):2283-2290.
- [5] KANG H, AN H J, SONG J Y, et al. NOTCH3

- and Jagged2 contribute to gastric cancer development and to glandular differentiation associated with MUC2 and MUC5AC expression[J]. *Histopathology*, 2012, 61(4): 576-586.
- [6] WU W K K, CHO C H, LEE C W, et al. Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2010, 295(2): 144-153.
- [7] MOLAEI F, FORGHANIFARD M M, FAHIM Y, et al. Molecular signaling in tumorigenesis of gastric cancer[J]. *Iran Biomed J*, 2018, 22(4): 217-230.
- [8] RADTKE F, RAJ K. The role of NOTCH in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor? [J]. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3(10): 756-767.
- [9] HUANG T, ZHOU Y, CHENG A S L, et al. NOTCH receptors in gastric and other gastrointestinal cancers: oncogenes or tumor suppressors? [J]. *Mol Cancer*, 2016, 15(1): 80.
- [10] HAN J, HENDZEL M J, ALLALUNIS T J. NOTCH signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment? [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(3): 210-218.
- [11] KIMURA K, SATOH K, KANNO A, et al. Activation of NOTCH signaling in tumorigenesis of experimental pancreatic cancer induced by dimethylbenzanthracene in mice [J]. *Cancer Sci*, 2007, 98(2): 155-162.
- [12] SERAFIN V, PERSANO L, MOSERLE L, et al. NOTCH3 signalling promotes tumour growth in colorectal cancer[J]. *J Pathol*, 2011, 224(4): 448-460.
- [13] OZAWA T, KAZAMA S, AKIYOSHI T, et al. Nuclear NOTCH3 expression is associated with tumor recurrence in patients with stage II and III colorectal cancer[J]. *Ann Surg Oncol*, 2014, 21(8): 2650-2658.
- [14] CAO K, TAIT S W G. Apoptosis and cancer: force awakens, phantom menace, or both? [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2018, 337: 135-152.
- [15] CHEN Y, CHEN S, LIANG H, et al. Bcl-2 protects TK6 cells against hydroquinone-induced apoptosis through PARP-1 cytoplasm translocation and stabilizing mitochondrial membrane potential[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2018, 59(1): 49-59.
- [16] HUANG K H, FANG W L, LI A F, et al. Caspase-3, a key apoptotic protein, as a prognostic marker in gastric cancer after curative surgery[J]. *Int J Surg*, 2018, 52: 258-263.

(收稿日期: 2020-03-12 修回日期: 2020-05-23)

(上接第 2978 页)

- [14] MARKS D C, VAN D M P F. Serum eye drops: a survey of international production methods[J]. *Vox Sang*, 2017, 112(4): 310-317.
- [15] MA I H, CHEN L W, TU W H, et al. Serum components and clinical efficacies of autologous serum eye drops in dry eye patients with active and inactive sjogren syndrome [J]. *Taiwan J Ophthalmol*, 2017, 7(4): 52-58.
- [16] AKCAM H T, UNLU M, KARACA E E, et al. Autologous serum eye-drops and enhanced epithelial healing time after photorefractive keratectomy [J]. *Clin Exp Optom*, 2017, 101(1): 34-39.
- [17] GIANNACCARE G, VERSURA P, BUZZI M, et al. Blood derived eye drops for the treatment of cornea and ocular surface diseases[J]. *Transfus Apher Sci*, 2017, 56(4): 595-604.
- [18] 胡欢, 韩玲玲, 张明昌. 角膜上皮功能障碍的研究进展[J/CD]. *中华眼科医学杂志*, 2019, 9(2): 124-128.
- [19] TORRICELLI A A M, MARINO G K, SANTHANAM A, et al. Epithelial basement membrane proteins perlecan and nidogen-2 are up-regulated in stromal cells after epithelial injury in human corneas[J]. *Exp Eye Res*, 2015, 134(12): 33-38.

(收稿日期: 2020-03-29 修回日期: 2020-05-12)